



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>



Research Article

Preparation of new macroporous hydrogel by formation of high internal phase emulsions (HIPEs) template and investigation of controlled release of doxorubicin drug

Ghasem Rezanejade Bardajee^{*}, Parinaz Pargolghasemi, Alireza Banaei

Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 23/Oct/2022

Revised: 23/Jan/2023

Accepted: 24/Jan/2023

Keywords:

Porous hydrogel, high internal phase emulsion, oil in water, acrylamide, sodium alginate, slow release, anticancer drug.

ABSTRACT

During recent years, the development of drug delivery systems based on polymers has created powerful carriers for smart application in nanomedicine for the treatment of diseases. Based on this, the design of polymers that contain various active functional groups to create a suitable interaction with the drug for its loading and release has been considered. Generally, more porosity for more drug loading, biocompatibility of the desired polymer and more water absorption lead to better performance in drug permeation and release.

In this research, the preparation of a template with a high internal phase emulsion (PolyHIPEs) based on polyacrylamide grafting onto sodium alginate (SA) biopolymer via free radical polymerization and PolyHIPEs method of oil-in-water emulsion type is presented. In this work, porous hydrogel with high water swelling (absorption) was prepared by using different concentrations of acrylamide (AAm), surface active agent, cross-linking agent and initiator. The highest equilibrium water swelling value of synthetic porous hydrogel with HIPEs method was 280 g/g, while the water swelling value of prepared hydrogel without HIPEs method was 25 g/g. The open-cell porous hydrogel with water swelling of 280, has average pores of 5-10 μm , 200 nm windows and porosity of 80-85%. Modern instrumental methods such as SEM, AFM, FT-IR, BET and TGA were used to identify the porous hydrogel of PolyHIPEs. The loading and controlled release of the doxorubicin anticancer drug was performed on the optimum porous hydrogel in laboratory conditions. The results showed that smart SA-g-PAAm hydrogel is suitable for drug release at 41 °C and pH 5.5 (cancer cell conditions).

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.28790.2111>

© 2023 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

^{*}.Corresponding author: Professor of Organic Chemistry. E-mail address: rezanejad@pnu.ac.ir

How to cite this article: Rezanejad, G., Pargolghasemi, P., & Banaei, A. (2023). Preparation of new macroporous hydrogel by formation of high internal phase emulsions (HIPEs) template and investigation of controlled release of doxorubicin drug. *Applied Chemistry*, 18(68), 251-270. (in Persian)

تهیه هیدروژل ماکرو متخلخل جدید با استفاده از الگوی امولسیون با فاز درونی بالا (HIPEs) و بررسی رهایش کنترل شده داروی دوکوروبیسین

قاسم رضانزاد بردجی*، پری ناز پرگل قاسمی، علیرضا بنایی

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۱/۰۸/۰۱

تاریخ تصحیح: ۰۱/۱۱/۰۳

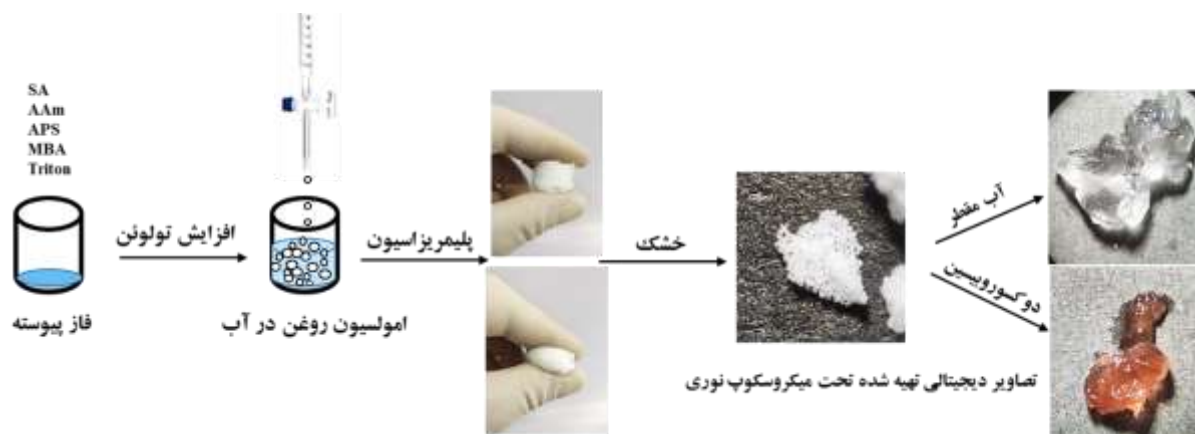
تاریخ پذیرش: ۰۱/۱۱/۰۴

چکیده

در طول سال‌های اخیر، توسعه سامانه‌های دارورسانی مبتنی بر پلیمرها، حامل‌های توانمندی را برای کاربرد هوشمند در نانوپزشکی برای درمان بیماری‌ها ایجاد کرده است. بر این اساس، طراحی پلیمرهایی که حاوی گروه‌های عاملی فعال متنوع جهت ایجاد برهم‌کنش مناسب با دارو برای بارگذاری و رهایش آن باشد، مورد توجه قرار گرفته است. عموماً، متخلخل فراوان‌تر برای بارگذاری بیشتر دارو، زیست‌سازگاری پلیمر مورد نظر و جذب آب بیشتر، منجر به عملکرد بهتر در نفوذ و رهایش دارو می‌شود. در این پژوهش تهیه قالب امولسیونی با فاز درونی بالا (PolyHIPE)، بر اساس پیوند پلی آکریل آمید بر روی زیست‌پلیمر سدیم آلژینات (SA) در طی پلیمریزاسیون رادیکال آزاد و روش PolyHIPEs از نوع امولسیون روغن در آب ارائه شده است. در این کار با استفاده از غلظت‌های مختلف آکریل آمید (AAM)، عامل سطح فعال، عامل شبکه‌ساز و آغازگر، هیدروژل متخلخل با جذب آب و تورم بالا تهیه شد. بالاترین مقدار جذب آب تعادلی هیدروژل متخلخل سنتز شده با روش HIPEs ۲۸۰ گرم/گرم و هیدروژل سنتز شده با همان مقادیر، بدون روش HIPEs برابر ۲۵ گرم/گرم بدست آمد. هیدروژل متخلخل سلول باز با خاصیت جذب آب تا ۲۸۰ برابر وزن خود و میانگین حفره‌های ۱۰-۵ میکرومتر و پنجره‌های ۲۰۰ نانومتر، تهیه شد. برای شناسایی هیدروژل متخلخل PolyHIPE از روش‌های آنالیز جدید مانند SEM، AFM، FT-IR، BET و TGA استفاده شد. بارگذاری و رهایش کنترل شده داروی ضد سرطان دوکوروبیسین بر روی هیدروژل متخلخل تهیه شده، در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج نشان داد هیدروژل SA-g-PAAM به طور هوشمند برای رهاسازی دارو در دمای ۴۱ درجه سانتیگراد و pH ۵/۵ (شرایط سلول‌های سرطانی) مناسب است.

کلمات کلیدی: هیدروژل متخلخل، امولسیون با فاز درونی بالا، روغن در آب، آکریل آمید، سدیم آلژینات، رهایش آهسته، داروی ضد سرطان.

چکیده تصویر



۱- مقدمه

در سال‌های اخیر تهیه پلیمرهای متخلخل از طریق امولسیون‌ها، به دلیل مساحت بالای سطح و جایگاه‌های فعال فراوان بر روی پلیمر، مورد توجه ویژه قرار گرفته است. ساختارهای تشکیل شده بعد از جامد شدن^۱ بر اساس حجم‌های مختلف فاز درونی تعریف می‌شوند، که عبارتند از: پلیمریزاسیون (پلیمر شده) با فاز درونی بالا^۲ (حجم فاز درونی ۷۴٪-۹۹٪، PolyHIPEs)، پلیمریزاسیون با فاز درونی متوسط^۳ (حجم فاز درونی ۳۰٪-۷۴٪، PolyMIPEs) و پلیمریزاسیون با فاز درونی پایین^۴ (حجم فاز درونی کمتر از ۳۰٪، PolyLIPEs) است [۱]. پلیمر شدن امولسیون با فاز درونی بالا شامل دو مرحله اساسی است: ۱- تهیه امولسیون از دو مایع غیر قابل امتزاج (فاز پیوسته و فاز پراکنده) و ۲- جامد شدن فاز پیوسته هنگام پلیمر شدن.

در PolyHIPEs، فاز پیوسته (فاز بیرونی) به فاز با مقدار کمتر (۲۵٪ و کمتر) و فاز پراکنده (فاز درونی) به فاز با مقدار بیشتر (۷۴٪ و بالاتر) گفته می‌شود. قطره‌های فاز پراکنده که توسط مواد سطح فعال^۵ در فاز پیوسته پخش شده‌اند، پس از پلیمر شدن، توسط روشی مانند استخراج از ساختار پلیمر خارج شده و در نتیجه محصول متخلخل تهیه می‌شود. عامل سطح فعال، ترکیبات دو قطبی با یک طرف محلول در آب و طرف دیگر محلول در روغن هستند، که به غیر یونی، آنیونی، کاتیونی و دوخصلتی دسته‌بندی می‌شوند. با اینکه انتخاب بهترین عامل سطح فعال، تجربی است، طبقه‌بندی کمی عامل سطح فعال با استفاده از مقدار عددی توازن آبدوست-آب‌گریز^۶ (HLB) انجام شده است. عامل سطح فعال با HLB پایین برای تهیه امولسیون‌های آب در روغن (w/o) و HLB بالا برای روغن در آب (o/w) استفاده می‌شود. با این‌که نوع، غلظت و HLB عامل سطح فعال برای تهیه امولسیون پایدار ضروری است [۲]، ولی پایداری و ریخت‌شناسی HIPE به عوامل دیگری مانند نوع و مقدار مونومر، حلال، دمای امولسیون و الکتروولیت نیز بستگی دارد. مقدار لازم از عامل سطح فعال برای تهیه امولسیون پایدار، ۲۰٪-۳۰٪ فاز پیوسته و در برخی موارد تا ۵۰٪ فاز پیوسته گزارش شده است [۳، ۴].

در بین امولسیون‌های HIPEs، بیشتر مطالعات بر روی امولسیون‌های آب در روغن است، در سال‌های اخیر تحقیقات در مورد امولسیون‌های روغن در آب، کربن دی‌اکسید در آب، روغن در روغن و مایع یونی در روغن، بیشتر شده است. از مزایای روش HIPE می‌توان به تخلخل بالا، اتصالات به‌هم پیوسته و اندازه منافذ قابل تنظیم، اشاره کرد [۵]. PolyHIPEs با توجه به وجود یا عدم وجود اتصالات، به دو دسته سلول باز (کاربرد در رهاسازی کنترل شده دارو، جذب، مهندسی بافت و ...) و سلول بسته (کاربرد در کپسوله سازی) تقسیم بندی می‌شوند. اندازه حفره‌ها معمولاً بین ۱۵۰-۱ میکرومتر و اندازه منافذ ریز بر روی حفره‌ها

¹ Solidification

² Polymerised high internal phase emulsions

³ Polymerised medium internal phase emulsions

⁴ Polymerised low internal phase emulsions

⁵ Surfactants

⁶ Hydrophile- lipophile balance

(پنجره‌ها)، ۵۰-۰/۲ میکرومتر است. در پلیمریزاسیون HIPE، از پلیمریزاسیون رادیکال آزاد^۱ (FRP) نسبت به پلیمریزاسیون‌های جاننشینی متقابل، حلقه گشا^۲ (ROMP)، دیلز آلدِر و ... بیشتر استفاده شده است [۶].

بیشترین تعداد مقالات در PolyHIPEs، مربوط به پلیمریزاسیون مونومر استایرن با استفاده از روش امولسیون آب در روغن و بررسی شرایط مختلف تهیه آن است. از اولین پژوهش‌هایی که به تهیه پلی آکریل آمید با روش HIPE اشاره کرده است، مقاله دکتر ژانگ^۳ و کوپر^۴ منتشر شده در سال ۲۰۰۲ است، که با استفاده از آکریل آمید و مونومرهای دیگر، مهره‌های متخلخل از طریق روغن در آب در روغن (o/w/o)، تهیه کردند [۷]. در سال ۲۰۰۹ توسط باربتا^۵ و همکاران زیست پلیمر متخلخل آلژینات، به روش HIPE، تهیه شد [۸]. در سال ۲۰۱۱، راتو^۶ و همکاران، با استفاده از مونومر آکریل آمید و شبکه‌ساز اتیلن گلیکول دی متاکریلات، PolyHIPE روغن در آب با بالاترین جذب ۴/۲-۶/۷ گرم بر گرم (درصد جذب آب ۶۷۰-۴۲۰) را گزارش کردند [۹]. فان^۷ و همکاران در سال ۲۰۱۸ با استفاده از آکریل آمید، متیلن بیس آکریل آمید، توین ۸۵، فاز پراکنده پارافین و مقدار کم عامل سطح فعال، PolyHIPE تحت نور یو وی (UV)، تهیه کردند [۱۰]. در سال ۲۰۱۹ ژانگ و سیلوراشتاین هیدروژل PolyHIPE حساس به دما با بالاترین جذب ۱۶۱ گرم بر گرم با استفاده از مونومر آکریل آمید تهیه کردند [۴]. در سال ۲۰۲۰ گونگ^۸ و همکاران از پروتئین سویا برای پایداری امولسیون HIPE روغن در آب آکریل آمید و آکرلیک اسید استفاده کردند، که در نتایج و بررسی این مقاله، بالاترین جذب آب پلیمر متخلخل تهیه شده ۵۵ گرم بر گرم و پلیمر غیر متخلخل ۱۴ گرم بر گرم گزارش شده است [۱۱]. زو^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۶ از پلیمر متخلخل بر پایه پلی آکرلیک اسید تهیه شده به روش HIPE برای حذف سریع یون‌های مس و سرب استفاده کردند [۱۲]. تهیه پلیمرهای دارای حفره‌های بزرگ با استفاده از آکرلیات توسط هوروزو^{۱۰} و همکاران گزارش شده است [۱۳]. چگالی کم و تخلخل بالای پلیمرهای تهیه شده از روش PolyHIPE، آن‌ها را برای کاربردهایی مانند جداسازی و فیلتراسیون [۱۴]، مهندسی بافت [۱۴]، کروماتوگرافی [۱۵]، حذف فلزات سنگین [۱۱]، ذخیره‌ی گاز و دارورسانی [۴] مناسب کرده است.

¹ Free radical polymerization

² Ring opening metathesis polymerization

³ Zhang

⁴ Cooper

⁵ Barbetta

⁶ Rao

⁷ Fan

⁸ Gong

⁹ Zhu

¹⁰ Horozov

به ترکیبات طبیعی که بیشتر از ۱۰ واحد مونوساکارید داشته باشند، پلی ساکارید گفته می شود. در سال های اخیر استفاده از پلی ساکاریدها در دارورسانی نسبت به پلیمرهای سنتزی بیشتر شده است. مزایای پلی ساکاریدها عبارتند از: زیست تخریب پذیری، غیر سمی بودن، فراوانی در طبیعت و مقالات متعددی در مورد رهایش کنترل شده داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین^۱ (DOX)، از پلی ساکارید آنیونی سدیم آلژینات (SA) منتشر شده است [۱۶]. در تعدادی از سیستم های دارورسانی کنترل شده بر پایه پلی ساکاریدهای حساس به محرک، تحویل مقدار مورد نیاز دارو در زمان و محل خاص در بدن بررسی شده است [۱۷]. با توجه به زیست سازگاری بالای پلی ساکارید سدیم آلژینات (SA) به عنوان یک زیست پلیمر طبیعی و همچنین تخلخل زیاد پلیمر سنتز شده بر پایه آن به روش PolyHIPE، در این پژوهش پلیمر متخلخل SA-g-PAAm با خاصیت جذب آب خیلی بالا از طریق امولسیون با فاز درونی بالا تهیه شد و توانایی این هیدروژل متخلخل در رهایش کنترل شده داروی DOX در شرایط آزمایشگاهی، بررسی شد. برای شناسایی و بررسی ساختار پلیمر از ابزارهایی مانند BET، SEM، AFM، FT-IR و TGA استفاده شد. همچنین، از دستگاه اسپکتروفتومتر برای مطالعه بارگذاری داروی DOX بر روی هیدروژل متخلخل و بررسی رهایش DOX استفاده شد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی

آکریل آمید، آمونیوم پرسولفات، سدیم آلژینات، تولوئن، متیلن بیس آکریل آمید، تریتون x100 و تترامیل اتیلن دی آمین ساخت شرکت مرک آلمان با خلوص بالا و بدون خالص سازی بیشتر استفاده شد. دوکسوروبیسین هیدروکلراید از داروخانه تهیه شد (ساخت شرکت اکتورکو ایران). در همه مراحل از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

۲-۲- دستگاه های مورد استفاده

ثبت طیف های FT-IR توسط دستگاه اسپکتروفتومتر IR Prestig-21، ساخت کارخانه Shimadzu ژاپن با استفاده از قرص KBr انجام شد. ریخت شناسی سطح و تخلخل با استفاده از تصاویر AFM مدل Nanosurf France core، SEM مدل TESCAN MIRA3 SEM company construction و BET مدل BELSORP mini II بررسی شد. آنالیز وزن سنجی حرارتی با استفاده از دستگاه TGA مدل Linseis STA-PT1000، انجام شد. از منبع حرارتی و همزن الکتریکی مدل Stuart CB162 استفاده شد. از میکروسکوپ نوری مدل Leica zoom 2000 و دوربین گوشی شیائومی جهت ثبت تصاویر دیجیتالی استفاده شد.

¹ Doxorubicin

۳-۲- تهیه هیدروژل متخلخل SA-g-PAAm با استفاده از روش HIPE

هیدروژل ابر جاذب متخلخل SA-g-PAAm با استفاده از روش امولسیون با فاز درونی بالا، روغن در آب (o-in-w)، از طریق پلیمریزاسیون رادیکالی در مقدار ثابت از فاز آبی و آلی به روش زیر تهیه شد.

فاز پیوسته (فاز بیرونی یا آبی)، شامل مقدارهای متفاوت از آغازگر آمونیوم پرسولفات (APS، ۰/۰۱۷ - ۰/۰۵۲ مول بر لیتر، ۰/۰۰۴ - ۰/۰۱۲ گرم)، عامل شبکه ساز متیلن بیس آکریل آمید (MBA، ۰/۰۲۴ - ۰/۰۷۷ مول بر لیتر، ۰/۰۰۳۷ - ۰/۰۱۲ گرم)، مونومر آکریل آمید (AAm، ۱۳/۵ - ۱/۶۸ مول بر لیتر، ۰/۹۶ - ۰/۱۲ گرم) و تریتون X=۱۰۰ (عامل سطح فعال، ۰/۴ - ۰/۱ میلی لیتر)، حل شده در ۱ میلی لیتر سدیم آلزینات ۳٪ (SA، ۰/۰۳ گرم در ۱ میلی لیتر آب)، مطابق با جدول ۱، تهیه شد. فاز پراکنده (فاز درونی یا آلی)، تولوئن (۵ میلی لیتر) - قطره - قطره (۱۵ قطره در دقیقه) به فاز آبی اضافه شد (سرعت همزن مغناطیسی، ۳۰۰ دور در دقیقه). بعد از افزودن فاز آلی، هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه ادامه داده شد تا امولسیون با درصد بالای فاز درونی گرانرو و سفید رنگ (شبه سس مایونز) تهیه شود. به امولسیون، کاتالیزگر تترا متیل اتیلن دی آمین (۴۰ میکرولیتر)، تحت گاز بی اثر آرگون، اضافه شد. سپس درب ظرف را محکم بسته و به مدت ۲ ساعت در حمام روغن قرار داده شد (حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد). پلیمر از قالب خارج و توسط استخراج سوکسله، (آب مقطر و اتانول - ۲۴ ساعت) شست و شو داده شد و در آن خلا (دما ۶۰ درجه سانتیگراد، ۲۴ ساعت) خشک شد.

۳-۲-۴- تهیه هیدروژل SA-g-PAAm به عنوان نمونه شاهد

با استفاده از مقادیر نمونه DD از جدول ۱ که بالاترین جذب را در ۲ ساعت اول نشان داد، هیدروژل بدون استفاده از روش HIPE (بدون اضافه کردن فاز پراکنده و عامل سطح فعال) تهیه شد. آمونیوم پرسولفات (۰/۱۱ مول بر لیتر، ۰/۰۲۵ گرم)، متیلن بیس آکریل آمید (۰/۱۶ مول بر لیتر، ۰/۰۲۵ گرم) و آکریل آمید (۴/۵ مول بر لیتر، ۰/۳۲ گرم)، به محلول سدیم آلزینات ۳٪ (۱ میلی لیتر)، اضافه شد. به محلول شفاف بدست آمده، تترا متیل اتیلن دی آمین (۴۰ میکرولیتر) افزوده و بقیه مراحل مانند قسمت ۳-۲ انجام شد.

جدول ۱. ترکیب فاز آبی و آلی امولسیون با فاز درونی بالا و نتایج جذب آب SR^۱ و ESR^۲

ESR	SR: 2h (g/g)	Tol ³ (mL)	Triton x100 (mL)	AAM (mol/L)	MBA (mol/L)	APS (mol/L)	SA 3% (mL)	sample
50.8	35-41	5	0.2	1.68	0.016	0.011	1	DG
40.4	28-31	5	0.2	3.09	0.016	0.011	1	DH
280	98-140	5	0.2	4.50	0.016	0.011	1	DD
35	27-32	5	0.2	6.75	0.016	0.011	1	DS
19	16.8-16.5	5	0.2	9.00	0.016	0.011	1	DQ
17	10-10.5	5	0.2	13.50	0.016	0.011	1	DR
114	78.2-91.6	5	0.2	4.50	0.0077	0.011	1	DL
55	62.8-60.4	5	0.2	4.50	0.024	0.011	1	DM
60	58-58.5	5	0.2	4.50	0.016	0.0052	1	DT
80	62.2-74.8	5	0.2	4.50	0.016	0.017	1	DU
54	52-51	5	0.1	4.50	0.016	0.011	1	DX
135	81-90	5	0.3	4.50	0.016	0.011	1	DZ
69	56.8-64.5	5	0.4	4.50	0.016	0.011	1	DY
25	22.8-23.4	0	0	4.50	0.016	0.011	1	DI

۲-۵- بررسی جذب آب هیدروژل‌های سنتزی

یک قطعه از هیدروژل متخلخل خشک (۰/۰۵ گرم)، در آب مقطر (۴۰ میلی لیتر) قرار داده شد. هیدروژل را در زمان‌های مشخص، از محلول خارج کرده و به مدت یک دقیقه بر روی کاغذ صافی قرار داده شد تا رطوبت ظاهری و اضافی آن حذف شود و سپس وزن هیدروژل متورم در زمان‌های مشخص یادداشت شد.

ظرفیت تورم (SR) هیدروژل در دمای محیط از رابطه ۱ محاسبه شد. رابطه (۱): $SR (g/g) = (W_2 - W_1) / W_1$

در رابطه بالا، W_2 وزن هیدروژل متورم (بعد از جذب آب) در زمان اندازه گیری، و W_1 وزن هیدروژل خشک است.

نسبت تورم تعادلی (ESR) به عنوان حداکثر آب جذب شده توسط SA-g-PAAm در شرایط تعادل با استفاده از رابطه ۲ محاسبه

شد. رابطه (۲): $ESR (g/g) = (W_{eq} - W_1) / W_1$

در رابطه ۲، W_{eq} وزن هیدروژل متورم پس از رسیدن به تعادل و W_1 وزن هیدروژل خشک است.

۲-۶- بارگذاری و رهایش داروی دوکسوروبیسین از PolyHIPE SA-g-PAAm

۰/۰۱ گرم، نمونه‌ی DD، به مدت ۲۴ ساعت در محلول داروی دوکسوروبیسین (۱۰ میلی لیتر، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار داده شد (در جای تاریک و بدون هم زدن). با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب محلول رویی (داروی جذب نشده بر روی هیدروژل) یادداشت شد. پلیمر چندین مرتبه با آب مقطر و بافر فسفات pH=۷/۴ شست‌وشو داده شد. سپس رهایش دارو در بافرهای pH=۵/۵ (دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد) و pH=۷/۴ (دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد) بررسی شد. در این راستا،

¹ Swelling ratio

² Equilibrium swelling ratio

³ Toluene

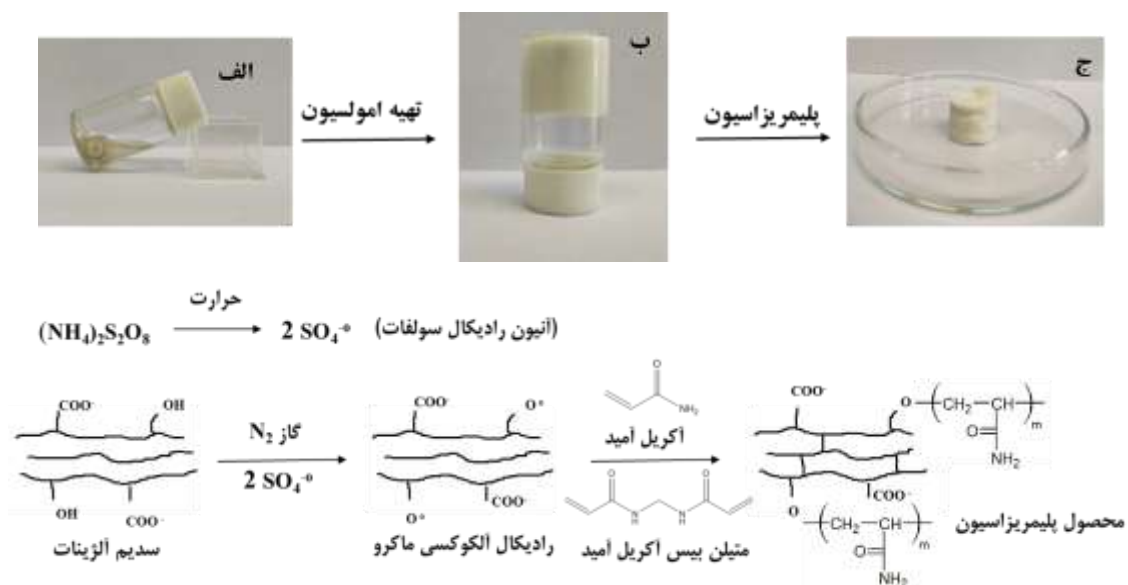
بر روی هیدروژل حاوی دارو، بافر فسفات سالین اسیدی (۱۰ میلی لیتر، pH=۵/۵، ۱ میلی گرم بر میلی مول) اضافه شد. در دو دمای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد، جذب محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتوی در طول موج ۴۹۰ نانومتر در زمان‌های مشخص (تا ۴۸ ساعت) ثبت شد. دوباره همین مراحل با بافر pH=۷/۴ و دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد انجام شد. غلظت دوکسوروبیسین آزاد شده از هیدروژل متخلخل سنتزی با استفاده از منحنی واسنجی (کالیبراسیون) دارو محاسبه شد.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- سنتز هیدروژل متخلخل SA-g-PAAm با استفاده از PolyHIPEs

در این پژوهش برای تهیه امولسیون HIPE، از حلال تولوئن با گشتاور دوقطبی ۰/۳۶ دمای به عنوان فاز آلی (فاز پراکنده) و عامل سطح فعال تریتون $\times 100$ (توازن آب دوستی-آب گریزی ۱۳/۴) استفاده شد [۱۸] و [۱۹].

شکل ۱-الف، تصویر دیجیتالی فاز آبی (مایع شفاف و شل) را نشان می‌دهد. پس از اضافه کردن فاز آلی (تولوئن) به فاز آبی (شکل ۱-ب)، امولسیون سفید رنگ (شبه سس مایونز) تهیه شد. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، با اینکه قالب شیشه‌ای، واژگون قرار داده شده است، امولسیون به اندازه‌ای محکم و پایدار هست که نمی‌ریزد. شکل ۱-ج، تصویر دیجیتالی از پلیمر یکپارچه تشکیل شده را نشان می‌دهد. پلیمریزاسیون آکریل آمید و آلزینات با استفاده از آغازگر پلیمریزاسیون رادیکالی APS، عامل شبکه ساز متیلن بیس آکریل آمید (MBA) و افزودن مقدار کمی از کاتالیزگر، تترامتیل اتیلن دی آمین (TEMED) انجام شد. با استفاده از کاتالیزگر TEMED، پلیمریزاسیون در دمای کمتر و زمان سریعتر انجام می‌شود [۹]. سازوکار (مکانیسم) پلیمریزاسیون در شکل (۱-د) نشان داده شده است.



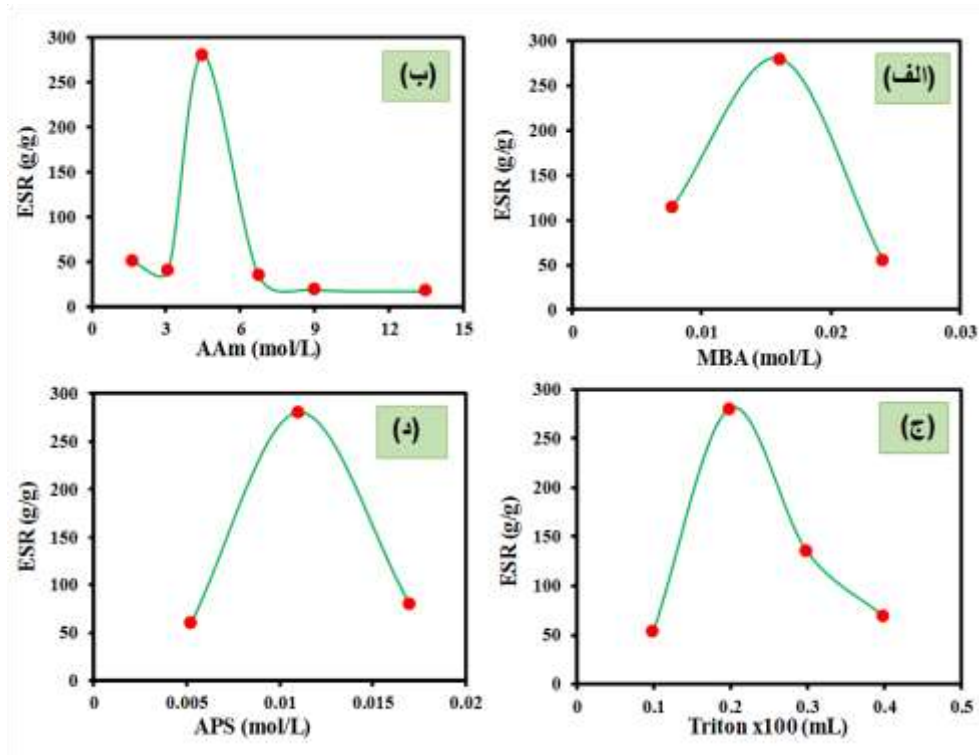
شکل ۱. (الف-ج) تصاویر دیجیتالی از تهیه PolyHIPE SA-g-AAm (الف) فاز آبی شامل SA، APS، MBA و تریتون، (ب) امولسیون تهیه شده بعد از اضافه کردن فاز آلی تولوئن و (ج) محصول پلیمریزاسیون و (د) سازوکار پلیمریزاسیون.

¹ Tetramethylethylenediamine

۳-۲- بهینه سازی مقادیر واکنش برای تهیه پلیمر با جذب آب

در همه آزمایش‌ها، فاز پیوسته (۱ میلی‌لیتر، ۱۶/۶٪) و فاز پراکنده (۵ میلی‌لیتر، ۸۳/۳٪) ثابت انتخاب شد. در شرایط یکسان، برای تهیه امولسیون پایدار با جدایی فاز کمتر هنگام پلیمریزاسیون، بهینه‌سازی متغیرهای مختلف مانند مقدار آغازگر، مونومر، عامل شبکه ساز و عامل سطح فعال مطابق مقادیر جدول ۱ انجام شد. تاثیر مقادیرهای مختلف از شبکه ساز، مونومر، عامل سطح فعال و آغازگر به ترتیب در نمودارهای ۲-الف تا د، بر تورم هیدروژل در آب، بررسی شد. با افزایش MBA نسبت به ESR، AAm، به دلیل اینکه تراکم اتصال عرضی بیشتر می‌شود، و جذب آب در مقادیر بالاتر از MBA، به دلیل سفتی (صلبیت) ساختار سنتزی، کاهش می‌یابد. در بررسی تاثیر غلظت مونومر بر تشکیل PolyHIPE با جذب آب بالا، در دو مقدار ۱/۶۸ و ۳/۰۹ مول بر لیتر از آکریل‌آمید، محصول یکپارچه و محکم تشکیل نشد که احتمالاً به دلیل مقدار کم مونومر نسبت به عامل شبکه ساز و آغازگر است. در مقادیرهای ۶/۷۵، ۹ و ۱۳/۵ مول بر لیتر از مونومر، امولسیون شل و ناپایدار تشکیل شد و هنگام پلیمر شدن، جدایی فاز آبی و آلی مشاهده شد.

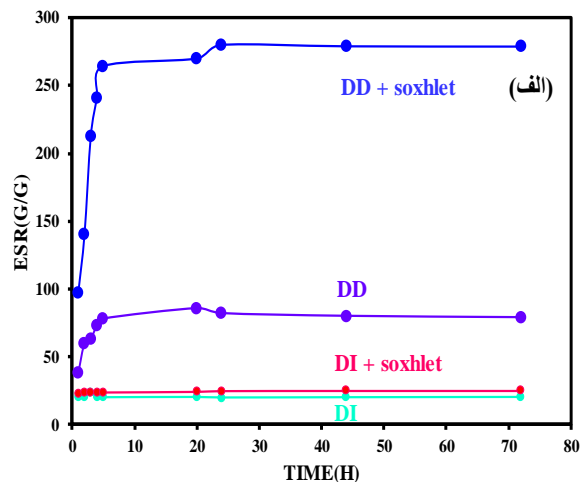
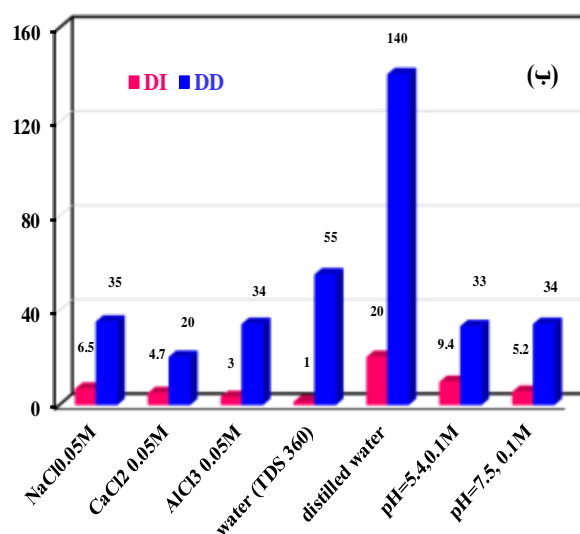
در بین مقادیر ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪ و ۴۰٪، از عامل سطح فعال نسبت به فاز آبی، تریتون ۰/۲ میلی لیتر، (۲۰٪ فاز آبی)، امولسیون با جذب آب بیشتر را نشان داد. همانطور که در شکل ۲-د مشاهده می‌شود با افزایش مقدار APS از ۰/۰۵۲ به ۰/۰۱۱ مول بر لیتر، رادیکال‌های آنیون سولفات بیشتری تولید می‌شود که باعث افزایش تعداد درشت رادیکال‌ها در زنجیره اصلی SA شده و در نتیجه تراکم پیوند PAAm افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر مقدار APS، کاهش تورم مشاهده شد، که دلیل آن، ایجاد تعداد رادیکال‌های بیشتر و در نتیجه اختتام بیشتر از طریق برخورد دو مولکولی و کاهش وزن مولکولی پلیمر است. در نتیجه فضاهای آزاد درون هیدروژل کاهش یافته و جذب آب نیز کمتر می‌شود [۲۰]. نتایج مقدار بهینه با کد نمونه DD در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۲. تاثیر مقادیر مختلف (الف) عامل شبکه ساز (۰/۰۰۷۷، ۰/۰۱۶ و ۰/۰۲۴ مول بر لیتر)، (ب) مونومر آکریل آمید (۱/۶۸، ۳/۰۹، ۴/۵، ۶/۷۵ و ۹ ۱۳/۵ مول بر لیتر)، (ج) عامل سطح فعال (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر) و (د) آغازگر (۰/۰۰۵۲، ۰/۰۱۱ و ۰/۰۱۷ مول بر لیتر).

برای حذف فاز پراکنده و مواد اولیه واکنش نداده از ساختار پلیمر، همچنین باز شدن حفره‌های تشکیل شده در ساختار محصول، از استخراج سوکسله در دو حلال آب و اتانول استفاده شد. مقایسه تاثیر سوکسله با حلال های آب و اتانول بر جذب آب در هیدروژل متخلخل تهیه شده با روش HIPE و بدون HIPE در نمودار ۳-الف گزارش شده است. منحنی جذب آب نمونه DD، قبل و بعد از استخراج سوکسله، نشان دهنده‌ی باز شدن حفره‌ها و تاثیر قابل توجه آن در تورم هیدروژل است. در نمونه DI که بدون روش HIPE تهیه شده است، استخراج سوکسله تاثیری بر جذب آب هیدروژل ندارد.

بررسی تورم دو هیدروژل DD و DI در محلول‌های سدیم کلرید (۰/۰۵ مولار)، کلسیم کلرید (۰/۰۵ مولار)، آلومینیوم کلرید (۰/۰۵ مولار)، آب مقطر، آب شهر با سختی ۳۶۰ ppm و بافر با pH ۵/۴ و ۷/۵ بررسی و مقایسه شد. نمودار ۳-ب نشان می‌دهد، در همه محلول‌ها، جذب آب هیدروژل متخلخل تهیه شده به روش HIPE (DD) چندین برابر جذب آب در هیدروژل تهیه شده بدون روش HIPE (DI) است. جذب آب هر دو هیدروژل DD و DI در محلول نمک، بافر و آب سخت نسبت به آب مقطر خیلی کمتر است، که به کاهش اختلاف فشار اسمزی بین شبکه هیدروژل و محلول خارجی مربوط است.



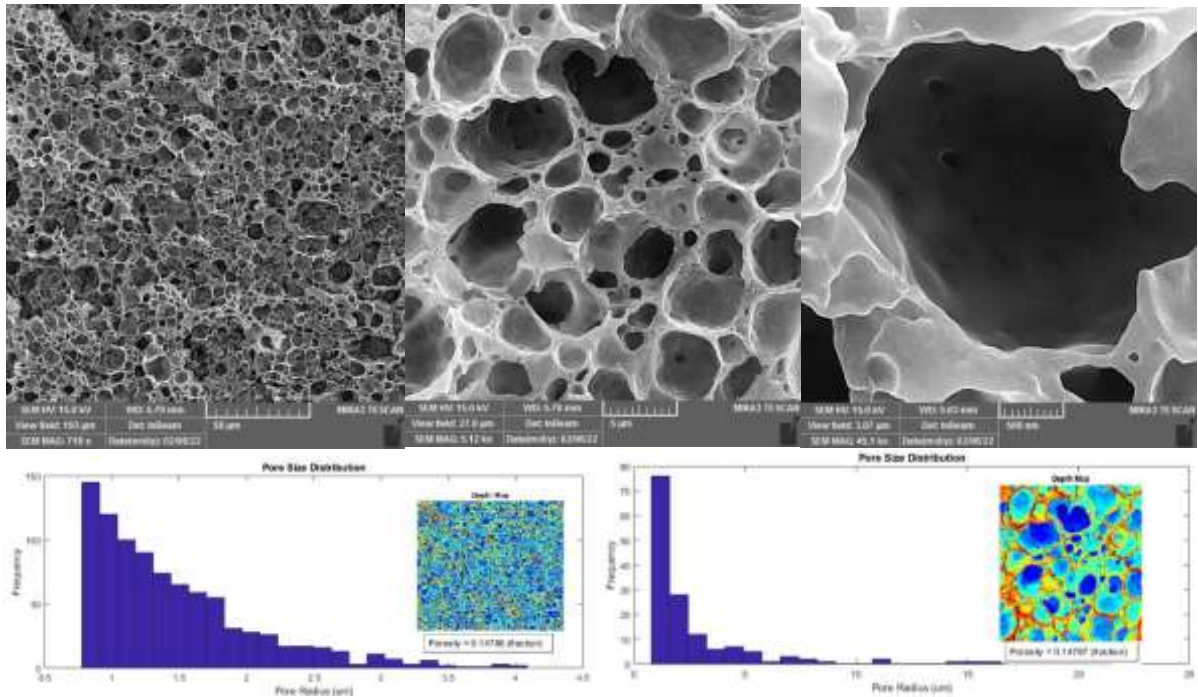
شکل ۳. الف) بررسی تاثیر سوکسله بر هیدروژل تهیه شده به روش HIPE (نمونه DD) و بدون HIPE (نمونه DI). ب) مقایسه جذب آب دو نمونه DD و DI در محلول‌های سدیم کلرید، کلسیم کلرید، آلومینیوم کلرید، آب شهر، آب مقطر و بافر با $pH=5/4$ و $pH=7/5$.

۳-۳- بررسی خصوصیات ریخت شناسی، مساحت سطح و تخلخل با تصاویر SEM، AFM و BET^۱

تصاویر SEM در بزرگنمایی‌های مختلف و محاسبه تخلخل و اندازه حفره‌ها با نرم افزار متلب در شکل ۴ نشان داده شده است. در تصاویر SEM، ساختار پلیمر متخلخل با حفره‌های متعدد و پنجره‌ها و منافذ کوچک روی دیواره حفره‌ها (سلول باز)، مشاهده می‌شود. حفره‌های بزرگ، در اثر اتصال قطره‌های کوچکتر از فاز پراکنده به یکدیگر و ایجاد قطره‌های بزرگتر (پدیده استوالد ریپنینگ^۲) به وجود آمده است. با حذف فاز پراکنده، حفره‌های کروی یا همان منافذ تشکیل می‌شوند. پنجره‌ها (روزنه‌های دیواره حفره‌ها) عامل اتصال حفره‌ها به یکدیگر هستند. این پنجره‌ها، هنگام پلیمریزاسیون، از انقباض نازک‌ترین نقاط پوشش فاز خارجی که فاز داخلی را احاطه کرده‌اند، به وجود آمده است.

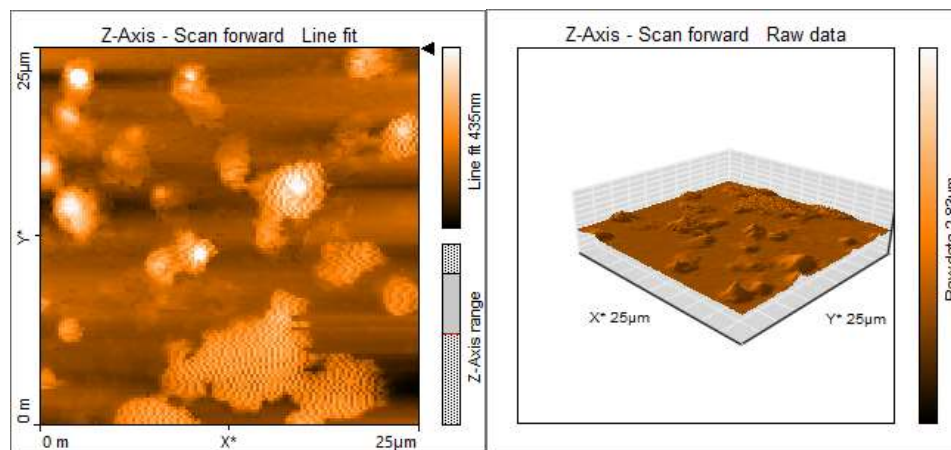
¹ Brinauer-Emmet-Teller

² Ostwald ripening



شکل ۴. تصاویر SEM نمونه DD در سه بزرگنمایی مختلف، بررسی تصاویر SEM با استفاده از نرم افزار متلب.

شکل ۵ تصاویر تهیه شده از پستی و بلندی‌های سطح پلیمر (توپوگرافی سطح) PolyHIPE SA-g-PAAm با استفاده از دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، تایید کننده‌ی سطح ناصاف و تخلخل بالا در پلیمر DD است.



شکل ۵. تصاویر دو بعدی و سه بعدی میکروسکوپ نیروی اتمی (۲۵×۲۵ میکرومتر) از هیدروژل متخلخل (نمونه DD)

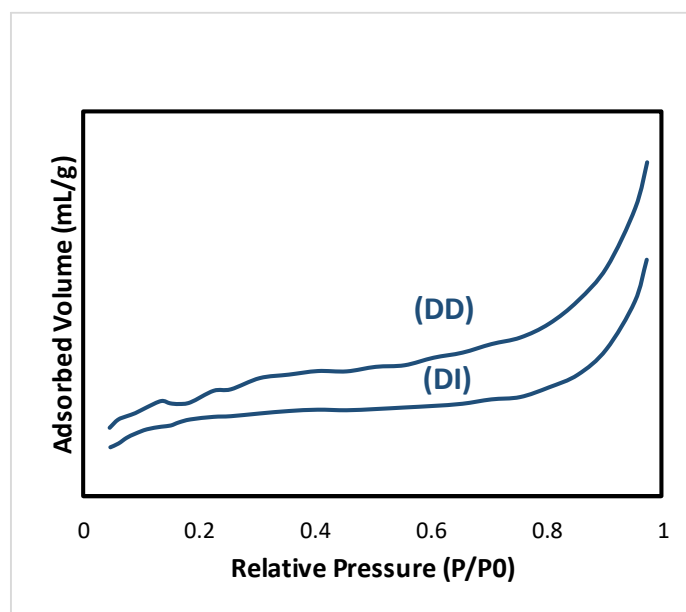
برای بررسی سطح ویژه و تخلخل نمونه هیدروژل سنتز شده، از آنالیز اندازه گیری سطح ویژه BET برای دو نمونه DD (نمونه سنتز شده با روش PolyHIPE) و DI (نمونه سنتز شده بدون روش PolyHIPE) استفاده شد. ایزوترم‌های جذب/اجذب نیتروژن نمونه های DD و DI در شکل ۶ نشان داده شده است. هر دو ماده ایزوترم نوع II را نشان دادند که مربوط به مواد درشت حفره است. مقادیر پارامترهای ساختاری به دست آمده از آنالیز BET در جدول ۲ فهرست شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان

می‌دهد که هیدروژل DD دارای مساحت سطح ویژه و حجم منافذ بزرگتری نسبت به نمونه هیدروژل DI است. این مساحت سطح ویژه بالاتر و حجم منافذ بزرگتر مرتبط با استفاده از روش پلی هایپ در تهیه نمونه DD است.

جدول ۲. خواص فیزیکوشیمیایی نمونه‌های هیدروژل DD و DI حاصل از آنالیز اندازه‌گیری سطح ویژه BET

نمونه	روش	S ^a	V ^b
DD	با استفاده از روش HIPE	۲۴	۰/۰۸۳
DI	بدون HIPE	۱۴	۰/۰۴۸۲۴

^a مساحت سطح ویژه برحسب (m²g⁻¹)، ^b حجم حفرات برحسب (cm³g⁻¹)



شکل ۶. ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن، نمونه‌های DI و DD.

۳-۴- نتایج طیف فرو سرخ و بررسی خواص حرارتی

بررسی طیف فرو سرخ، FT-IR، محدوده طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹، در شکل ۷ نشان داده شده است. در طیف مربوط به سدیم آلزینات (SA)، نوار پهن در ۳۴۴۰ cm⁻¹ مربوط به ارتعاشات کششی گروه OH بوده و دو نوار جذبی ۱۶۱۰ cm⁻¹ و ۱۴۱۷ cm⁻¹ مربوط به گروه COO- است. نوار جذبی در ناحیه ۲۹۲۰ cm⁻¹ نشان دهنده ارتعاش کششی CH بر روی حلقه است. نوار جذبی در ۱۰۳۰ cm⁻¹ مربوط به ارتعاشات کششی C-O بوده و نوار جذبی در ۸۱۹ cm⁻¹، مربوط به ارتعاش Na-O در سدیم آلزینات است [۲۱، ۲۲]. در طیف FT-IR آکریل آمید، ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن در ناحیه ۳۳۵۲ cm⁻¹ و ۳۱۹۲ cm⁻¹ مربوط به گروه آمید نوع اول (NH₂) است. نوار جذبی در ۱۶۷۴ cm⁻¹ به ارتعاشات کششی C=O و نوار جذبی در ۱۶۱۲ cm⁻¹ به N-H

نسبت داده می‌شود. همچنین نوارهای 1429 cm^{-1} و 1280 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات خمشی C-H و امید مربوط است [۲۳].

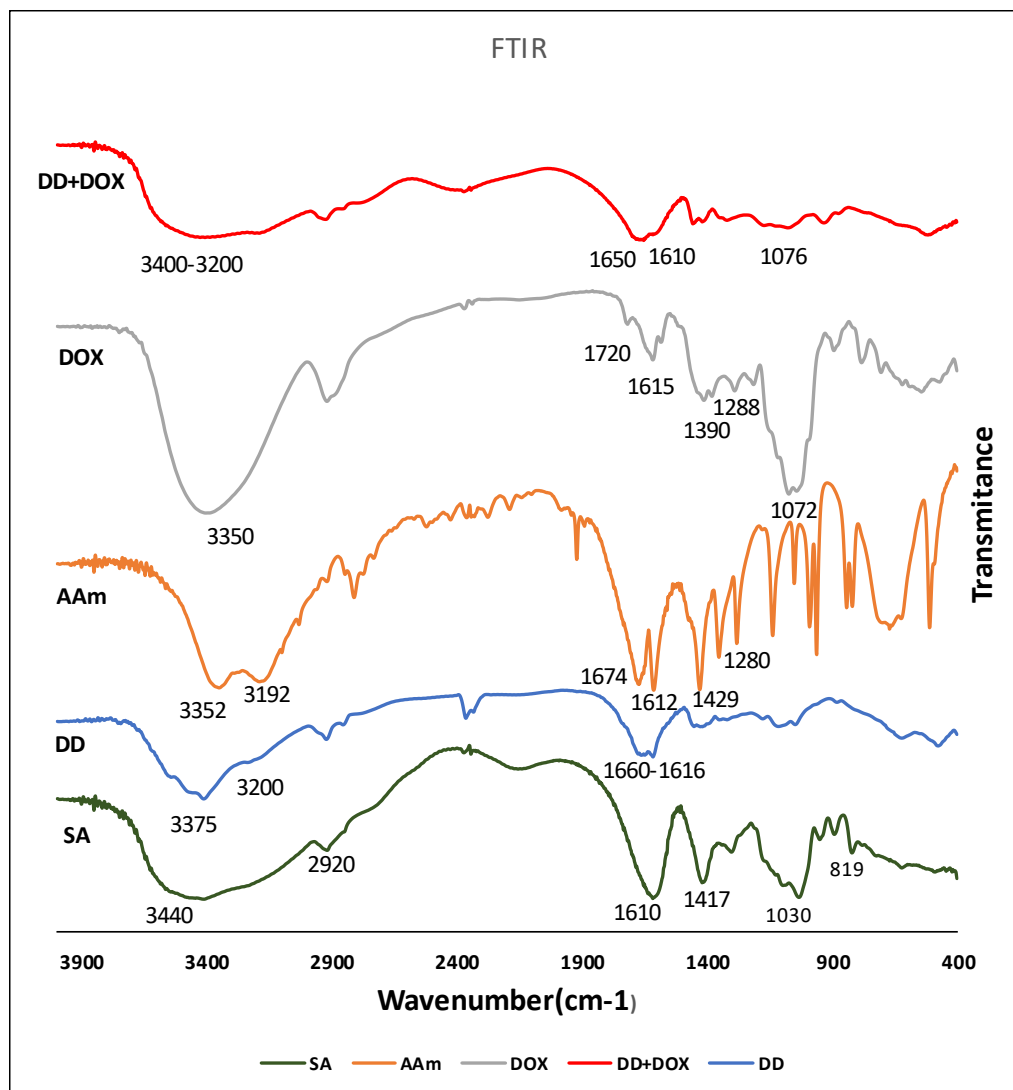
در طیف FT-IR دو کسورویسین، نوار جذبی در 3350 cm^{-1} ، مربوط به ارتعاشات کششی O-H و N-H است. نوار جذبی در 1720 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاش کششی گروه C=O است. نوارهای 1600 cm^{-1} و 1390 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات خمشی N-H و O-H گروه‌های آمین و فنول مربوط است. نوار جذبی در 1288 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاش کششی C-O و نوار جذبی در 1120 cm^{-1} به دلیل فرکانس کششی C-N گروه آمین و 1072 cm^{-1} به علت فرکانس کششی C-O گروه الکل است [۲۴].

در طیف FT-IR نمونه‌ی DD (هیدروژل تهیه شده به روش HIPE)، نوار جذبی در موقعیت 1660 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن گروه COO^- و بقیه گروه‌های کربنیل موجود در ساختار DD است. نوار جذبی گروه COO در سدیم آلزینات در 1610 و در آکریل امید 1674 ظاهر شده بود که بعد از پلیمریزاسیون در ناحیه 1660 به صورت پهن‌تر ظاهر شده است. پیک شاخص گروه‌های OH, NH در موقعیت 3375 cm^{-1} است، که هنوز مقداری از اثر دوتایی شدن به علت وجود گروه امید نوع اول (NH_2) در آن وجود دارد.

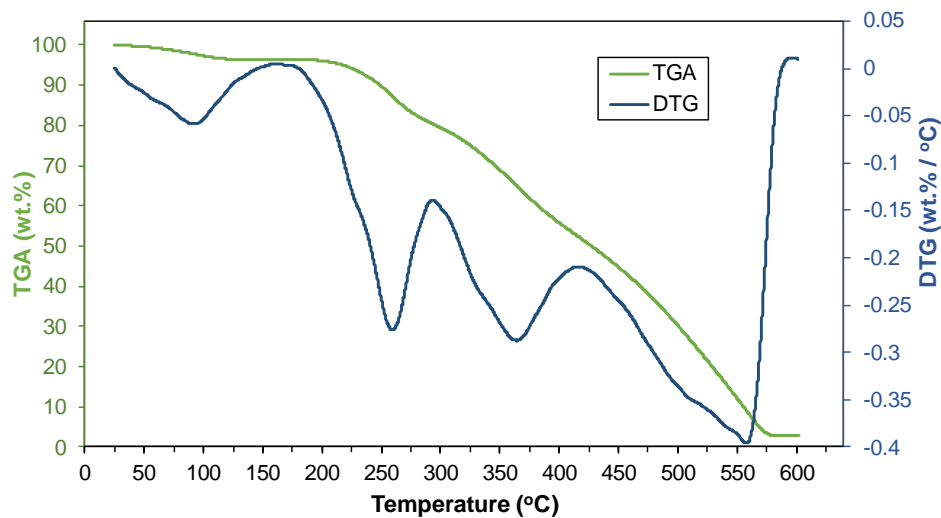
پیک پهن در طیف DD+DOX در محدوده $3200-3400 \text{ cm}^{-1}$ تایید کننده وجود گروه‌های OH, NH است، در این طیف، مقداری از اثر دوتایی شدن به علت وجود گروه امید نوع اول (NH_2) در آن، وجود دارد. همچنین ارتعاشات کششی نامتقارن گروه COO^- و بقیه گروه‌های کربنیل موجود در ساختار در حدود 1650 cm^{-1} مشاهده می‌شود، که به علت هم پوشانی آنها، به صورت پهن‌تر دیده می‌شوند. وجود گروه‌های عاملی C=O, O-H, N-H, C-O و C-H در ساختار هیدروژل سنتزی با استفاده از طیف FTIR تایید می‌شود که نشان دهنده مشارکت شیمیایی آکریل امید و سدیم آلزینات در تهیه هیدروژل است، هرچند به دلیل وجود برهم کنش‌های تازه بین آنها، تغییرات جزئی در ظاهر پیک‌ها مشاهده می‌شود [۲۲].

در شکل ۸، منحنی‌های TGA و DTG هیدروژل متخلخل آورده شده است که مربوط به بررسی رفتار حرارتی ماده در دماهای مختلف است. محور y با رنگ سبز در شکل، مربوط به منحنی TGA است. محور X در پایین شکل مربوط به دما، (Temperature) ($^{\circ}\text{C}$) و محور Y، مرتبط با تغییر درصد وزنی ماده است (wt. %) که از ۱۰۰ درصد شروع می‌شود. در منحنی TGA مشاهده می‌شود که با افزایش دما، درصد وزنی کاهش می‌یابد و بنابراین نشان می‌دهد که جرم به دلیل عملیات حرارتی به طور مداوم در حال تغییر است. در منحنی TGA، ابتدا تجزیه در دمای پایین‌تر شروع می‌شود و تغییر درصد وزنی تا دمای بالا ادامه می‌یابد. برای درک بهتر رفتار حرارتی ماده در برابر دما، از منحنی DTG استفاده می‌شود. محور y با رنگ سورمه‌ای در شکل، مربوط به منحنی DTG است. DTG نوعی آنالیز گرمایی است که در آن سرعت (نرخ) تغییر وزن ماده بر حسب دما ترسیم می‌شود و برای تحلیل بهتر منحنی TGA استفاده می‌شود. منحنی DTG در واقع نمودار مشتق TGA است. کاهش وزن با توجه به زمان متمایز

می‌شود و سپس مقادیر به دست آمده در برابر دما رسم می‌شود، که در عمل سرعت تغییر وزن بر حسب دما ترسیم می‌شود. بر این اساس، محور Y سورمه ای مرتبط با سرعت تغییر وزن ماده است (wt. % / °C) و عموماً دارای مقادیر منفی (کمتر از صفر) است. بر این اساس، تغییرات وزن نمونه‌ی هیدروژل DD در دماهای مختلف بر اساس منحنی های TGA و DTG در جدول ۳ خلاصه شده است.



شکل ۷. طیف های فرسرخ سدیم آلژینات (SA)، هیدروژل (DD)، آکریل آمید (AAm)، دوکسوروبیسین (DOX) و دوکسوروبیسین بارگذاری شده در هیدروژل متخلخل (DD+DOX).



شکل ۸. نمودار TGA و DTG هیدروژل متخلخل PolyHIPE SA-g-Aam

جدول ۳. تغییرات وزن نمونه‌ی DD در دماهای مختلف.

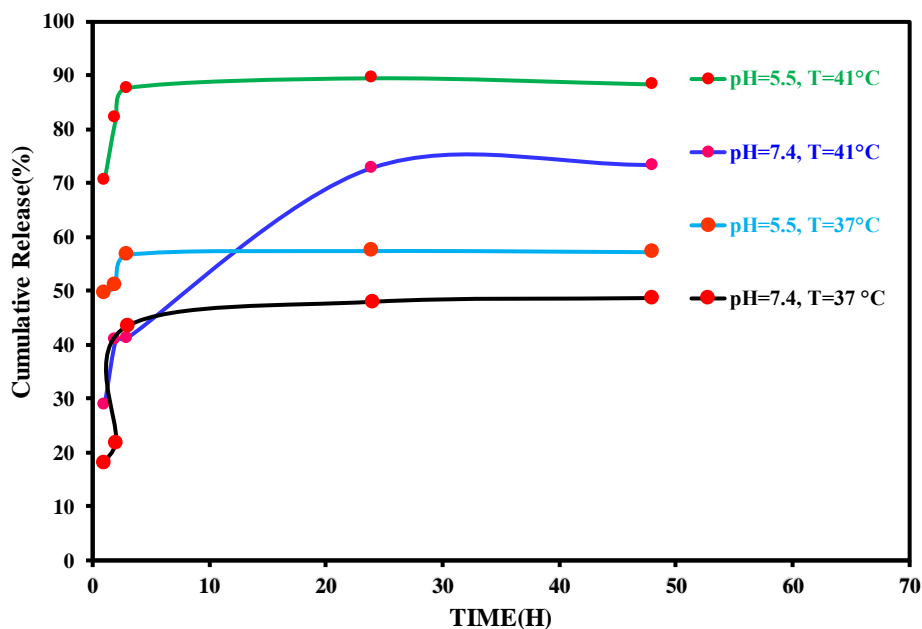
تغییر وزن (%)	دمای اوج فرایند (°C)	دمای اتمام فرایند (°C)	دمای شروع فرایند (°C)	مراحل کاهش وزن
۳/۳	۹۴	۱۱۵	۲۵	مرحله‌ی اول
۱۶/۶	۲۶۰	۲۹۷	۱۶۷	مرحله‌ی دوم
۲۸/۷	۳۶۴	۴۲۰	۲۹۷	مرحله‌ی سوم
۴۸/۵	۵۵۹	۵۸۰	۴۲۰	مرحله‌ی چهارم

۳-۵- مطالعه بارگذاری و ره‌ایش داروی DOX بر روی PolyHIPE SA-g-Aam

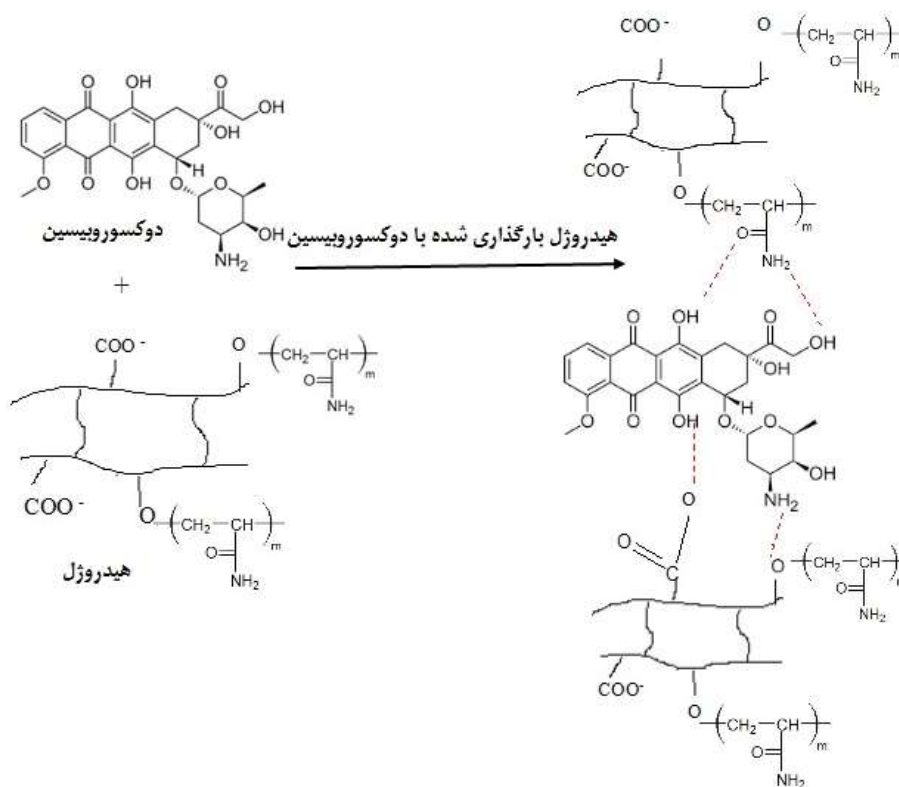
هیدروژل متخلخل تهیه شده، حاوی گروه‌های عاملی فعال کربوکسیلیک اسید، هیدروکسیل و آمید است. داروی DOX نیز حامل گروه‌های عاملی فعال آمین، هیدروکسیل و کربنیل است. بنابراین هیدروژل تهیه شده از طریق برهمکنش‌هایی مانند پیوند هیدروژنی، الکترواستاتیکی و برهم‌کنش اسید-باز بین گروه‌های مختلف مانند آمین و کربوکسیلیک اسید، داروی دوکسوروبیسین را جذب می‌کند. شمایی از برخی برهم‌کنش‌های موجود بین دارو و هیدروژل در شکل ۱۰ به صورت نمادین نشان داده شده است. DOX با توجه به خاصیت جذب آب بالای هیدروژل و جاذبه‌های مختلف بین این دو، سریع در ساختار هیدروژل وارد می‌شود و در محیط اسیدی ملایم تمایل به جداسازی و ره‌ایش DOX دارد، در نتیجه‌ی این انتشار، داروی حساس به pH تشکیل می‌شود.

بر اساس منحنی واسنجی (کالیبراسیون)، داروی بارگذاری شده بر روی نمونه هیدروژل DD، ۶۱٪/۴ است. بعد از بارگذاری، در شرایط آزمایشگاهی، ره‌ایش دارو، جهت بررسی اثر pH و دما انجام شد. برای تشخیص تفاوت انتشار در محیط شبیه‌سازی شده، pH ۷/۴ و ۵/۵، با توجه به ماهیت اسیدی خارج سلولی بافت‌های سرطانی، انتخاب شد. به دلیل اینکه دما در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های عادی بالاتر است، ره‌ایش دارو در دو دمای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد بررسی شد [۲۶]. انتشار پایدار

از هیدروژل متخلخل حاوی دارو، در ۴۸ ساعت، رهایش حساس به pH و دما را نشان داد. همانطور که در شکل ۹ مشاهده می‌شود، سرعت و مقدار رهایش دارو در pH=۵/۵ و دمای ۴۱ درجه، نسبت به شرایط دیگر بررسی شده، سریع‌تر و بالاتر است. رهایش دارو به برهم‌کنش الکترواستاتیکی (نوعی برهم‌کنش برگشت‌پذیر)، مربوط می‌شود.



شکل ۹. رهایش دارو از PolyHIPE SA-g-AAm در pH=۵/۵ و pH=۷/۴ در دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتیگراد



شکل ۱۰. شمایی از برخی برهم‌کنش‌های بین داروی دوکسوروبیسین و هیدروژل

۳-۶- نتیجه گیری

در این پژوهش، پلی آکریل آمید از طریق پلیمریزاسیون رادیکال آزاد بر زنجیره سدیم آلژینات (پلی ساکارید طبیعی) پیوند زده شد. برای تهیه این قالب متخلخل از روش امولسیون با فاز درونی بالا (روغن در آب) استفاده شد. از پلی ساکارید آلژینات به دلیل مزایایی مانند قیمت ارزان، در دسترس بودن، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و تجدیدپذیری استفاده شد. تهیه پلیمر متخلخل حاوی گروه‌های عاملی مختلف با جذب آب بالا برای ایجاد برهم کنش مناسب با دارو، جهت بارگذاری و رهایش آن، ما را بر آن داشت تا پلیمر SA-g-PAAm را با استفاده از روش PolyHIPE سنتز نماییم. برای تهیه پلیمر متخلخل با جذب آب بالا، تاثیر مقادیرهای متفاوت آغازگر، مونومر، عامل سطح فعال و شبکه ساز بررسی شد. نتایج نشان داد که تغییر در غلظت مونومر و عامل سطح فعال تاثیر بیشتری بر جذب آب دارند. جذب تورم تعادلی در آب مقطر برای PolyHIPE SA-g-PAAm، ۲۸۰ گرم بر گرم و برای هیدروژل تهیه شده با همان مقادیر بدون روش PolyHIPE، ۲۵ گرم بر گرم به دست آمد. رفتار تورمی برای هیدروژل با روش HIPE و بدون این روش در محلول‌های مختلف بررسی و مقایسه شد و ملاحظه شد که خاصیت تورم هیدروژل متخلخل (HIPE) در همه موارد بیشتر از ۴ برابر هیدروژل ساده است. بارگذاری و رهایش داروی دوکسوروبیسین در دو دما و pH مختلف بررسی شد، رهایش دارو در دمای ۴۱ درجه سانتیگراد و pH ۵/۵ (شرایط مشابه دما و pH بیرون سلولی بافت‌های سرطانی)، بیشتر است.

۴- تقدیر و تشکر

با تشکر از حمایت و همکاری دانشگاه پیام نور.

۵- فهرست منابع و ماخذ

- [1] Aldemir Dikici, B., Claeysens, F. (2020). Basic principles of emulsion templating and its use as an emerging manufacturing method of tissue engineering scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (8), 875.
- [2] Brusotti, G., Calleri, E., Milanese, C., Catenacci, L., Marrubini, G., Sorrenti, M., Girella, A., Massolini, G., Tripodo G. (2016). Rational design of functionalized polyacrylate-based high internal phase emulsion materials for analytical and biomedical uses. *Polymer Chemistry*, (7), 7436-7445.
- [3] Aldemir Dikici, B. (2020). Development of emulsion templated matrices and their use in tissue engineering applications, University of Sheffield, 2020.
- [4] Zhang, T., Silverstein, M.S. (2019). Robust, highly porous hydrogels templated within emulsions stabilized using a reactive, crosslinking triblock copolymer. *Polymer*, (168) 146-154.
- [5] Silverstein, M.S. (2014). Emulsion-templated porous polymers: A retrospective perspective *Polymer*, (55) 304-320.

- [6] Silverstein, M.S. (2014). PolyHIPEs: Recent advances in emulsion-templated porous polymers. *Progress in Polymer Science*, (39) 199-234.
- [7] Zhang, H., Cooper, A. (2002). Synthesis of monodisperse emulsion-templated polymer beads by oil-in-water-in-oil (O/W/O) sedimentation polymerization. *Chemistry of materials*, (14) 4017-4020.
- [8] Barbetta, A., Barigelli, E., Dentini, M. (2009). Porous alginate hydrogels: synthetic methods for tailoring the porous texture. *Biomacromolecules*, (10) 2328-2337.
- [9] Rao, K.M., Anbanathan, N., Rajulu, A.V. (2011). Bicontinuous highly cross-linked poly (acrylamide-co-ethyleneglycol dimethacrylate) porous materials synthesized within high internal phase emulsions. *Soft Matter*, (7) 10780-10786.
- [10] Fan, X., Zhang, S., Zhu, Y., Chen, J. (2018). Macroporous polymers prepared via frozen UV polymerization of the emulsion-templates stabilized by a low amount of surfactant. *RSC advances*, (8) 10141-10147.
- [11] Gong, X., Rohm, K., Su, Z., Zhao, B., Renner, J., Manas-Zloczower, I., Feke, D.L. (2020). Porous hydrogels templated from soy-protein-stabilized high internal phase emulsions. *Journal of Materials Science*, (55) 17284-17301.
- [12] Zhu, Y., Zheng, Y., Wang, F., Wang, A. (2016). Monolithic supermacroporous hydrogel prepared from high internal phase emulsions (HIPEs) for fast removal of Cu²⁺ and Pb²⁺. *Chemical Engineering Journal*, (284) 422-430.
- [13] Althubeiti, K.M., Horozov, T.S. (2019). Efficient preparation of macroporous poly (methyl methacrylate) materials from high internal phase emulsion templates. *Reactive and Functional Polymers*, (142) 207-212.
- [14] Naranda, J., Sušec, M., Maver, M., Gradišnik, L., Gorenjak, M., Vukasović, A., Ivković, A., Rupnik, M.S., Vogrin, M., Krajnc, P. (2016). Polyester type polyHIPE scaffolds with an interconnected porous structure for cartilage regeneration. *Scientific reports*, (6) 1-11.
- [15] Krajnc, P., Leber, N., Štefanec, D., Kontrec, S., Podgornik, A. (2005). Preparation and characterisation of poly (high internal phase emulsion) methacrylate monoliths and their application as separation media. *Journal of Chromatography A*, (1065) 69-73.
- [16] Kulkarni, R.V., Inamdar, S.Z., Das, K.K., Biradar, M.S. (2019). Polysaccharide-based stimuli-sensitive graft copolymers for drug delivery, *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*. Elsevier. 155-177.
- [17] Li, J., Mooney, D.J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, (1) 1-17.
- [18] Barbetta, A., Dentini, M., Zannoni, E.M., De Stefano, M.E. (2005). Tailoring the porosity and morphology of gelatin-methacrylate polyHIPE scaffolds for tissue engineering applications. *Langmuir*, (21) 12333-12341.

- [19] Myers, D. (2005). The organic chemistry of surfactants, Surfactant Science and Technology, John Wiley & Sons, Inc, 29-79.
- [20] Behrouzi, M., Moghadam, P.N. (2018). Synthesis of a new superabsorbent copolymer based on acrylic acid grafted onto carboxymethyl tragacanth. Carbohydrate polymers, (202) 227-235.
- [21] Stancu, I.-C., Lungu, A., Dragusin, D.M., Vasile, E., Damian, C., Iovu, H. (2013). Porous gelatin-alginate-polyacrylamide scaffolds with interpenetrating network structure: synthesis and characterization. Soft Materials, (11) 384-393.
- [22] İsmail, O., Gökçe Kocabay, Ö. (2021). Absorption and adsorption studies of polyacrylamide/sodium alginate hydrogels. Colloid and Polymer Science, (299) 783-796.
- [23] Tanwar, A., Date, P., Ottoor, D. (2021). ZnO NPs incorporated gelatin grafted polyacrylamide hydrogel nanocomposite for controlled release of ciprofloxacin. Colloid and Interface Science Communications, (42) 100413.
- [24] Obireddy, S.R., Chintha, M., Kashayi, C.R., Venkata, K.R.K.S., Subbarao, S.M.C. (2020). Gelatin-coated dual cross-linked sodium alginate/magnetite nanoparticle microbeads for controlled release of doxorubicin. ChemistrySelect, (5) 10276-10284.
- [25] Manjula, B., Varaprasad, K., Sadiku, R., Raju, K.M. (2013). Preparation and characterization of sodium alginate-based hydrogels and their in vitro release studies. Advances in polymer technology, (32).
- [26] Xue, Y., Xia, X., Yu, B., Luo, X., Cai, N., Long, S., Yu, F. (2015). A green and facile method for the preparation of a pH-responsive alginate nanogel for subcellular delivery of doxorubicin. RSC advances, (5) 73416-73423.